原 著

卵巣癌腫瘍マーカーの腫瘍細胞内局在
に関する研究

弘前大学医学部産科婦人科学教室

須郷 孝信 丸山 英俊 佐藤 重美 齊藤 良治

卵巣癌腫瘍組織内の腫瘍マーカーの局在を詳細に検討するため、6種類の組織型の卵巣腫瘍、計52例のパラフィン包埋組織標本を薄切後、酵素抗体法による免疫染色(ABC法)ならびに蛍光免疫染色を施し、それらをそれぞれ光学顕微鏡ならびに共焦点レーザー顕微鏡(confocal laser scanning microscope, CLSM)で観察した。使用した腫瘍マーカーの抗体はCA 125, CEA, CA 19-9, CA 54, CA 61, CA 602, AFPの7種の抗体であり、組織内のこれら抗原の局在を立体的に観察するためCLSM用の組織切片は酵素抗体法のそれよりは厚く、10~20 μm とした。また、CLSM用の蛍光染色にあたっては、抗体の希釈濃度、反応時間、温度に関し、それぞれ予備実験を行い、得られた成績に基づき指摘条件を設定した。

その結果、CEA, CA 19-9, CA 54, CA 602の4種類の腫瘍マーカーの細胞内局在に関し、従来の酵素抗体法でのそれよりも、詳細な所見を得ることができた。

Key words : Ovarian cancers—Tumor markers—CLSM—Review

I. 緒 言

腫瘍マーカーの組織、細胞内局在検索は、これまでモノクローナル抗体を用いた免疫染色により行われてきた。最近、共焦点レーザー顕微鏡(confocal laser scanning microscope, 以下CLSM)^{1,2)}が開発、実用化されるにいたり、腫瘍マーカーの腫瘍細胞内局在に

ついてこの方法を用い立体的観点からより詳細な検討が可能となった。しかし、CLSMを用いて卵巣癌細胞内の各種腫瘍マーカーの局在を検討した報告はこれまでにはない。そこで私たちはCLSM法を用いて各種腫瘍マーカーの卵巣癌腫瘍細胞内局在を検討し、得られた成績を従来の光学顕微鏡による検討法で得られた成績と比較して、腫瘍マーカーの腫瘍細胞内局在検索におけるCLSM法の有用性を検討した。

II. 研究材料および方法

1. 研究材料

弘前大学医学部附属病院産婦人科で1981年1月から1993年8月までの12年間に治療を受けた卵巣腫瘍症例のうち、手術によって原発巣が摘出された52症例の悪性卵巣腫瘍検体を研究材料とした(表1)。

2. 腫瘍細胞内腫瘍マーカーの検索法

摘出された卵巣悪性腫瘍を10%ホルマリン液にて固定後、保存されていたパラフィン包埋ブロックをミ

A study on localization of tumor marker antigens in ovarian tumor tissue using confocal laser scanning microscopy : comparison between immunoperoxidase staining and fluorescence staining

Takanobu SUGO, M.D., Hidetoshi MARUYAMA, M.D., M. I.A.C., Shigemi SATO, M.D., M.I.A.C., Yoshiharu SAITO, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Hirosaki University School of Medicine

論文別刷請求先 ☎ 036 青森県弘前市在府町5 弘前大学医学部産科婦人科学教室 須郷孝信

平成6年6月13日受付

平成6年9月9日受理

表 1 組織型と検索症例数

組 織 型	症例数
漿液性嚢胞腺癌	25 例
粘液性嚢胞腺癌	8 例
類 内 膜 腺 癌	4 例
明 細 胞 腺 癌	7 例
転 移 性 卵 巢 癌	7 例
未 熟 奇 形 腫	1 例
計	52 例

表 3 蛍光抗体法の方法

1. 10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片の脱パラフィン
2. 抗原の賦活 (0.1%トリプシンで37°C, 15分)
3. 非特異的染色阻止 (正常ヤギ血清, 室温, 1時間)
4. 一次抗体反応 (4°C, 12時間)
5. ビチオン標識二次抗体反応 (室温, 1時間)
6. ストレプトアビジン標識FITCにて発色 (4°C, 12時間)
7. propidium iodine (PI) にて核染色 (室温, 5分)
8. 無蛍光グリセリンにて封入

クロトームにて薄切し組織標本を作製した。なおその際、薄切切片は染色過程での膨化収縮による剝離を防止するためにシランコーティングスライド³⁾に貼布した。52症例の組織標本のそれぞれにつきCA 125^{4,5)}, carcinoembryonic antigen (CEA)⁶⁻⁸⁾, CA 19-9⁶⁾, CA 54⁹⁻¹³⁾, CA 61⁹⁻¹³⁾, CA 602^{13,14)}, α -fetoprotein (AFP)^{15,16)}の7種類の腫瘍マーカーの染色性の有無ならびに細胞内染色部位を以下に述べる酵素抗体法と蛍光抗体法により検索した。

1) 酵素抗体法 (以下I法) (表2)

酵素抗体法には avidin-biotinylated peroxidase complex method (ABC法)¹⁷⁾を用いた。組織切片は脱パラフィン後、0.3% H₂O₂にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、また二次抗体と組織との非特異的反応を阻止するため二次抗体と同種の正常血清 (正常ヤギ血清) を反応させた。一次抗体として抗マウスモノクローナル抗体CA 125, CA 19-9, 抗ラビットポリクローナル抗体CEA, AFP (以上DAKO社製), 抗マウスモノクローナル抗体CA 54, CA 61, CA 602 (以上持田製薬製)を使用した。使用した一次抗体の希釈倍数はあらかじめ行った予備実験成績に基づき、CA 125, CA 19-9, CA 54, CA 61, CA 602については至適希釈倍数を100倍とし、0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.6) にて希釈した。また、CEA および AFP 抗体は同様予備実験成績に基づき、希釈せず原液を用いた。発色は diaminobenzidine tetrahydro-

表 2 酵素抗体法の方法

1. 10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片の脱パラフィン
2. 内因性ペルオキシダーゼ阻害 (0.3% H₂O₂, 室温, 10分)
3. 非特異的染色阻止 (正常ヤギ血清, 室温, 30分)
4. 一次抗体反応 (37°C, 1~12時間)
5. ビチオン標識二次抗体反応 (室温, 10分)
6. ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (室温, 10分)
7. DAB にて発色 (室温, 10分)
8. ヘマトキシリンで核染色 (室温, 1分)
9. 脱水, 透徹, 封入

chloride (DAB) で行った。陰性対照には一次抗体に各動物の正常血清をそれぞれ反応させた。

2) 蛍光免疫染色法 (以下F法) (表3)¹⁸⁾

CLSM 観察用の組織標本切片は立体像観察のために10~20 μ mの厚きとした。一次抗体の反応については、今回組織標本切片を厚くしたため通常の一次抗体の反応条件ではよい染色性が得られず、下記に示した予備実験により設定した反応条件を用いた。蛍光色素は0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.6) で100倍希釈したstreptoavidin標識fluorescein isothiocyanate (FITC, DAKO社製)を用いた。さらにpropidium iodine (PI, DAKO社製)にてPI-FITC二重染色を行った。これにより組織内の腫瘍マーカーは緑色に、また核は赤色に染色された。封入はFITCの蛍光の褪色を防ぐため、褪色防止剤p-phenylenediamineを含むグリセリンで行った。なお陰性対照は一次抗体の反応を省略した。

なお、F法の一次抗体反応条件設定のため：(1) 一次抗体濃度として各抗体について原液から10000倍の希釈系列をつくり、(2) その反応温度としては4°C, 室温および37°Cの3条件を、(3) 反応時間としては10分, 30分, 1時間, 2時間, 12時間の5条件をそれぞれ設定のうえ、(1)~(3)のそれぞれすべての組み合わせで予備実験を行った。その結果、一次抗体の希釈濃度はCEAおよびAFPでは10倍希釈、CA 125およびCA 19-9では100倍希釈、CA 54, CA 61およびCA 602では100~1000倍希釈が至適濃度であった。希釈は0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.6) で行った。また反応温度は4°C, 反応時間は12時間が最も至適であるとの成績が得られたので、本研究ではこれらの条件でF法による染色を行った。

3) 光学顕微鏡, CLSM による観察

I法を用いた標本は光学顕微鏡で観察した。また、F法を用いた標本はCLSM (LSM-10, Carl Zeiss社

製)にて観察した。CLSMの観察では標本の水平および垂直断面をそれぞれ1~2 μ mで走査して観察した。

3. 推計学的検討法

上記の成績の有意差の有無の検討は χ^2 検定(Fisher法)を用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

III. 成 績

1. 細胞内腫瘍マーカーの検索

1) CA 125 の染色結果 (表4)

CA 125 は I 法, F 法とも漿液性囊胞腺癌症例で陽性率が最も高くそれぞれ80%, 56%であった。また, 細胞内局在は I 法, F 法とも CA 125 陽性全検体における細胞質のみに局在のみられた例 (以下 C-type) が多かった (写真1, 2)。

2) CEA の染色結果 (表5)

CEA は I 法では粘液性囊胞腺癌症例で陽性率が最も高く (88%), 一方, F 法では転移性卵巣癌症例で陽性率が最も高かった (86%)。また, 細胞内局在は CEA 陽性全検体において, I 法では細胞膜のみの例 (以下 M-type) が多く, F 法では有意に細胞質と細胞膜の両者の例 (以下 B-type) が多かった ($p < 0.05$) (写真3, 4)。

3) CA 19-9 の染色結果 (表6)

CA 19-9 は I 法, F 法ともに転移性卵巣癌症例でその陽性率が最も高くそれぞれ71%, 51%であった。細胞内局在は CA 19-9 陽性全検体において, I 法では M-type が多く, F 法では有意に B-type が多かった ($p < 0.05$) (写真5, 6)。

4) CA 54 の染色結果 (表7)

CA 54 は I 法では粘液性囊胞腺癌症例で陽性率が最も高く (63%), F 法では転移性卵巣癌症例で陽性率が最も高かった (43%)。細胞内局在は CA 54 陽性全検体において, I 法で C-type の例が, F 法では有意に B-type が多かった ($p < 0.01$) (写真7, 8)。

5) CA 61 の染色結果 (表8)

CA 61 は I 法で粘液性囊胞腺癌症例で最も陽性率が高く (63%), F 法では全症例で30%以下であった。細胞内局在は CA 61 陽性全検体において, I 法では細胞質のみの例と C-type と B-type の例に分かれた。F 法では有意に B-type が多かった ($p < 0.01$) (写真9, 10)。

表4 CA 125 陽性例の細胞内局在

組 織 型	I 法				F 法			
	M	C	B	計	M	C	B	計
漿液性囊胞腺癌	1	16	3	20	3	6	5	14
粘液性囊胞腺癌	0	0	4	4	0	0	3	3
類内膜腺癌	0	2	0	2	0	2	0	2
明細胞腺癌	0	4	0	4	0	2	1	3
転移性卵巣癌	0	1	1	2	0	2	0	2
計	1	23	8	32	3	12	9	24

M: 細胞膜のみが染色されたもの

C: 細胞質のみが染色されたもの

B: 細胞膜と細胞質が染色されたもの

写真1 I 法による CA 125 陽性細胞 (漿液性囊胞腺癌)。細胞質にびまん性に CA 125 が局在している ($\times 100$)

写真2 F 法による CA 125 陽性細胞 (漿液性囊胞腺癌)。I 法と同様に細胞質に CA 125 がびまん性に局在している ($\times 1800$) (核は PI による蛍光発色を示している) 上 1/2: 垂直断面像, 下 1/2: 水平断面像

6) CA 602 の染色結果 (表9)

CA 602 は I 法, F 法とも漿液性囊胞腺癌症例でその陽性率が最も高くそれぞれ64%, 48%であった。

表 5 CEA 陽性例の細胞内局在

組 織 型	I 法				F 法			
	M	C	B	計	M	C	B	計
漿液性嚢胞腺癌	2	2	1	5	1	0	4	5
粘液性嚢胞腺癌	6	1	0	7	3	0	2	5
類内膜腺癌	0	0	1	1	0	0	0	0
明細胞腺癌	0	0	1	1	0	0	1	1
転移性卵巣癌	5	0	1	6	3	0	3	6
計	13	3	4	20	7	0	10	17

M：細胞膜のみが染色されたもの

C：細胞質のみが染色されたもの

B：細胞膜と細胞質が染色されたもの

写真 3 I 法による CEA 陽性細胞（粘液性嚢胞腺癌）。管腔側の細胞膜に CEA が局在している（×100）

写真 5 I 法による CA 19-9 陽性細胞（粘液性嚢胞腺癌）。細胞膜に CA 19-9 が局在している（×40）

細胞内局在は CA 602 陽性全検体において I 法で C-type が、F 法では有意に B-type が多かった ($p < 0.01$) (写真 11, 12)。

7) AFP の染色結果

AFP は未熟奇形腫症例のみで陽性所見が得られ、細胞内局在が I 法、F 法ともに C-type であった。

表 6 CA 19-9 陽性例の細胞内局在

組 織 型	I 法				F 法			
	M	C	B	計	M	C	B	計
漿液性嚢胞腺癌	3	3	0	6	1	1	2	4
粘液性嚢胞腺癌	3	1	0	4	1	0	1	2
類内膜腺癌	1	0	0	1	0	1	0	1
明細胞腺癌	1	1	1	3	0	0	1	1
転移性卵巣癌	3	0	2	5	1	0	3	4
計	11	5	3	19	3	2	7	12

M：細胞膜のみが染色されたもの

C：細胞質のみが染色されたもの

B：細胞膜と細胞質が染色されたもの

写真 4 F 法による CEA 陽性細胞（粘液性嚢胞腺癌）。I 法と CLSM の水平断面像では CEA は細胞膜のみにみられたが、垂直断面像では細胞質にも局在していることがわかる（核は PI による蛍光発色を示している）。上 1/2：垂直断面像，下 1/2：水平断面像（×1000）

写真 6 F 法による CA 19-9 陽性細胞（粘液性嚢胞腺癌）。I 法と同様に細胞膜のみに CA 19-9 は局在している（核は PI による蛍光発色を示している）。上 1/2：垂直断面像，下 1/2：水平断面像（×1000）

表 7 CA 54 陽性例の細胞内局在

組 織 型	I 法				F 法			
	M	C	B	計	M	C	B	計
漿液性嚢胞腺癌	0	4	0	4	0	0	2	2
粘液性嚢胞腺癌	0	4	1	5	0	0	3	3
類内膜腺癌	0	1	0	1	0	0	1	1
明細胞腺癌	0	2	0	2	0	1	1	2
転移性卵巣癌	0	1	2	3	0	0	3	3
計	0	12	3	15	0	1	10	11

M:細胞膜のみが染色されたもの

C:細胞質のみが染色されたもの

B:細胞膜と細胞質が染色されたもの

写真 7 I 法による CA 54 陽性細胞 (粘液性嚢胞腺癌)。細胞質にびまん性に CA 54 が局在している (×40)

写真 9 I 法による CA 61 陽性細胞 (粘液性嚢胞腺癌)。細胞膜と細胞質に CA 61 が局在している (×40)

表 8 CA 61 陽性例の細胞内局在

組 織 型	I 法				F 法			
	M	C	B	計	M	C	B	計
漿液性嚢胞腺癌	0	3	2	5	0	1	3	4
粘液性嚢胞腺癌	0	4	1	5	0	0	2	2
類内膜腺癌	0	1	0	1	0	0	1	1
明細胞腺癌	0	1	1	2	0	0	2	2
転移性卵巣癌	0	0	2	2	0	0	1	1
計	0	9	6	15	0	1	9	10

M:細胞膜のみが染色されたもの

C:細胞質のみが染色されたもの

B:細胞膜と細胞質が染色されたもの

写真 8 F 法による CA 54 陽性細胞 (粘液性嚢胞腺癌)。I 法では細胞質のみに CA 54 の局在がみられたが、CLSM ではその他に細胞膜にも局在がみられる。上 1/2: 垂直断面像, 下 1/2: 水平断面像 (×1800)

写真 10 F 法による CA 61 陽性細胞 (粘液性嚢胞腺癌)。I 法と同様に細胞質と細胞膜に局在がみられる。上 1/2: 垂直断面像, 下 1/2: 水平断面像 (×1800)

IV. 考 察

組織抗原検出法 (免疫組織化学) には多くの方法があるが、そのうち広く普及しているのは I 法と F 法である。I 法の特徴は感度が高く、染色標本は永久標本

となり得、また電顕レベルでの観察も可能なことがあげられる。しかし、本法は感度がよい反面偽陽性も多く、染色のコントラストがやや不良なため微小抗原の観察には不利であるとの欠点も指摘されている。一方、F 法は抗体を蛍光標識して反応させ、その蛍光を

表 9 CA 602 陽性例の細胞内局在

組 織 型	I 法				F 法			
	M	C	B	計	M	C	B	計
漿液性嚢胞腺癌	0	12	4	16	0	4	8	12
粘液性嚢胞腺癌	0	0	2	2	0	0	1	1
類 内 膜 腺 癌	0	2	0	2	0	1	0	1
明 細 胞 腺 癌	2	1	0	3	0	0	3	3
転 移 性 卵 巢 癌	0	1	1	2	0	0	2	2
計	2	16	7	25	0	5	14	19

M：細胞膜のみが染色されたもの

C：細胞質のみが染色されたもの

B：細胞膜と細胞質が染色されたもの

写真 11 I 法による CA 602 陽性細胞（漿液性嚢胞腺癌）。細胞質と細胞膜に CA 602 が局在している（×40）

写真 12 F 法による CA 602 陽性細胞（漿液性嚢胞腺癌）。I 法では細胞膜と細胞質の両者に CA 602 の局在がみられたが、CLSM の水平、垂直断面像では細胞質のみに局在がみられる（核は PI による蛍光発色を示している）。上 1/2：垂直断面像，下 1/2：水平断面像（×1000）

検出するものであり、その特徴は特異性がきわめて高く、染色のコントラストが良好なことである。しかし、本法は蛍光が褪色しやすく（1～2 週間）、永久標本とはならないこと、また暗視野での観察のため組織細胞構築の識別が困難で、抗原の局在を正確に把握しにくいこと、さらに電顕レベルでの観察が不可能であるなどの欠点が指摘されている。

癌組織や細胞内の腫瘍マーカーの局在に関する研究はこれまで主に I 法で行われてきた。しかし、組織標本で I 法を行う場合には光学顕微鏡の分解能の限界から腫瘍マーカーの細胞内分布状態の詳細な観察は困難であった。このためこれまでは癌組織から主にタッチスメアを作製し、それを I 法で免疫染色して細胞内局在が検討されてきた。今回、著者は CLSM を用いることで F 法のもつ高い特異性を生かすとともに、従来の蛍光顕微鏡を用いる場合の欠点であった抗原の局在を把握しにくい欠点を補うことができた。また CLSM を用いた場合には、組織切片上においても個々の細胞の同定がスメア標本の検索の場合と同様に可能であることを示すことができた。ただし F 法で CLSM を用いて観察するに際しては、試料作製上解決すべき種々の問題が生じた。たとえば細胞を立体的に観察できるという CLSM の特徴を生かすため組織標本切片の厚さを通常の I、F 法に用いる厚さより数倍厚く作製したことにより、色素が浸透する体積が大となるため、偽陽性となる部分が相対的に多くなり、陽性部位の判定が困難となるなどの問題がそれである。本研究ではこの問題を解決するため、方法の項で述べたように使用する一次抗体の濃度、反応温度、および時間のそれぞれにつき詳細な予備実験を行って、その成績に基づき F 法での至適濃度、至適温度および至適反応時間の設定を行った。

今回、卵巢癌細胞内での陽性率と局在様式を検討した腫瘍マーカーのうち、CA 125 についてはその抗体 OC 125 がコア蛋白を認識するとされているが、その場合のコア蛋白に関連する抗原を認識する抗体は、主要認識部位が蛋白質部分にあるのか、また糖鎖が抗原エпитープにある程度関与しているのかは現在でも明らかにされていない。今回の成績でも CA 125 の陽性率は I 法の場合で漿液性嚢胞腺癌症例で 80% であった。また、粘液性嚢胞腺癌症例、類内膜腺癌症例、明細胞腺癌症例、および転移性卵巢癌症例での CA 125 の陽性率はそれぞれ 50%、50%、57%、および 29% であり、これらはいずれも漿液性嚢胞腺癌症例の場合

よりも低率であった。一方、F法による成績ではCA 125陽性率は漿液性嚢胞腺癌症例、粘液性嚢胞腺癌症例、類内膜腺癌症例、明細胞腺癌症例、および転移性卵巣癌症例がそれぞれ56%, 38%, 50%, 43%, および14%であった。このように漿液性嚢胞腺癌症例、明細胞腺癌症例でのF法による陽性率は一見、I法での陽性率に比して低率と思われたが、統計学的にはこの差は有意ではなかった。これはI法は感度が、F法は特異性がそれぞれ優れていることが影響しているために生じた結果と思われる。今回の成績ではI法で32例中、M-typeが1例、C-typeが23例、B-typeが8例、F法でM-typeが3例、C-typeが12例、B-typeが9例であり、細胞質のみならず細胞膜、あるいは細胞質と細胞膜の両者にCA 125の局在を認めるものがかなりみられた。これらは抗体OC 125が細胞に多数存在するエピトープを一様に認識したために生じた結果と考えられる。

CEAは一般に癌細胞ないし胎児細胞の膜のいわゆるglycocalyx(糖衣)中に存在するとともに分泌粘液中にも認められる物質とされている。CEAの細胞内陽性率は粘液性嚢胞腺癌症例でI法により70~100%との報告がある⁶⁻⁸⁾。著者のI法とF法による成績は粘液性嚢胞腺癌症例、転移性卵巣癌症例でそれぞれ88%/63%, 86%/86%であり、従来の報告とほぼ同様の成績であった。また、漿液性嚢胞腺癌、類内膜腺癌、明細胞腺癌症例でのCEAの細胞内陽性率はI法、F法ともに0~25%といずれも低率であった。CEAの癌細胞内局在所見の成績については、CEAが主として細胞膜の管腔側に局在しているのはCEAの抗原認識部位が細胞膜上の糖蛋白であると推測されていることとよく一致した所見であろう。また、CEAが細胞質内にもみられたことについては、分泌された粘液が細胞質側にも浸透し、それがFITCにより認識されたのではないかと推定される。

CA 19-9はヒト結腸、直腸培養細胞SW 116を免疫原として作製されたモノクローナル抗体NS-199によって認識される1型糖鎖抗原である。臨床的には良性疾患でも陽性率が高いため、比較的癌特異性の低いマーカーとされている。著者のI法による成績で粘液性嚢胞腺癌症例、転移性卵巣癌でそれぞれ50%, 71%であり、その他の症例では50%以下であった。また、F法による成績はいずれも統計学的に有意差はなかったもののI法の場合より低率であった。細胞内局在についてはI法では有意に細胞膜のみに局在し、F法で

は有意に細胞膜と細胞質に局在するものが多かった。これはCEAについて述べた理由と同様の理由によって細胞質でのCA 19-9陽性所見が生じたものと考えられた。

CA 54/61は、ヒト肺大細胞癌培養細胞株C-1509の培養上清抽出物を免疫原として作製された2種類のモノクローナル抗体MA 54およびMA 61により認識される抗原であり、現在までのところMA 54は末端にシアル酸(NeuAc α 2-6 Galactose)を含むムチン型糖鎖を、またMA 61はシアル酸を含まないムチン型糖鎖を認識することが判明している。両者はムチン型糖蛋白の母核糖関連抗原で^{9,10,13)}、CEAと同様に粘液産生腫瘍において粘液産生部位の細胞膜上の糖蛋白に抗原認識部位があるとされている。今回の著者の成績ではCA 54, CA 61の細胞内陽性率については、I法では粘液性嚢胞腺癌症例でそれぞれ63%/63%, 転移性卵巣癌症例でそれぞれ43%/29%であった。また、その他の症例でのI法による成績はいずれも30%以下であった。さらにF法による成績も同様にいずれの症例においてもそれぞれ50%以下であり、低率であった。また、CA 54/61の細胞内局在所見としては、どの卵巣癌の場合でも腫瘍細胞の細胞膜のみに局在するものはみられず、さらにI法では細胞質内のみに局在するものが、F法では細胞質内および細胞膜の両者に局在するものが多かった。CA 54/61がCEAと臨床的に類似した腫瘍マーカーであることから考えると、著者のF法で得た成績がこの腫瘍マーカーの粘液性嚢胞腺癌細胞内での局在をより正確に示している可能性が高いと思われる。

CA 602は卵巣明細胞腺癌細胞株RMG-IIを免疫原として作製されたマウスモノクローナル抗体MA 602により認識される抗原であり、抗原決定基はCA 125分子上にあるとされている^{10,13)}。著者の今回の成績ではCA 602の陽性率はI法で漿液性嚢胞腺癌症例で64%, 類内膜腺癌症例で50%, 明細胞腺癌症例で43%, その他の症例で30%以下であり、またF法ではこれらがそれぞれ48%, 25%, 43%, およびその他の症例では30%以下でありいずれもそれほど高率ではなかった。さらにCA 602の細胞内局在所見については、CA 125の場合と同様に漿液性嚢胞腺癌症例の場合にI法で主として細胞質内にびまん性にその局在がみられ、一方F法では細胞質内とともに細胞膜にもその局在がみられた。これに対し、類内膜腺癌症例や明細胞腺癌症例ではI法でもF法でもCA 602の細

胞内局在につき一定の傾向を定め得なかった。

AFP はヒト原発肝臓腫瘍から精製された物質であり、その糖鎖構造は AFP 1 分子あたり 1 本のアスパラギン結合糖鎖があり、ヒドラジン分解により遊離させるオリゴ糖は高圧炉紙電気泳動で中性画分に分画される。著者の成績では陽性であった未熟奇形腫の 1 例の細胞内局在部位は細胞質であった。

以上、今回著者が検討した 7 種類の腫瘍マーカーに関し総括すると、その細胞内陽性率はどのマーカーの場合でも I 法と F 法とで有意差はなかった。一方、その細胞内局在所見については CEA, CA 19-9, CA 54, CA 602 の 4 種類の腫瘍マーカーについては I 法に比べ F 法でより詳細な所見が得られた。これは I 法の観察に光学顕微鏡を用い、F 法の観察には CLSM を用いたことが主な原因になったものと考えられる。すなわち光学顕微鏡ではその解像度の限界のため細胞膜上の陽性所見を確認できず、また細胞質内の分布状態の詳細な観察もできなかったためと思われる。

今後、癌遺伝子や増殖因子など今回著者が検討した以外のマーカーについても CLSM を用いて検討が行われるならば、これまでとは異なる所見も得られるものと期待される。

Summary

The fluorescence staining method using a confocal laser scanning microscope (CLSM) was performed to investigate the detailed localization of tumor marker antigens in ovarian tumor tissue, and the results obtained were compared to those of immunoperoxidase staining (ABC method). Formalin-fixed paraffin-embedded ovarian tumor tissue (6 types from 52 cases) and 7 tumor marker antibodies (CA 125, CEA, CA 19-9, AFP, CA 54, CA 61, and CA 602) were used in this study. For fluorescence staining, the tissue was cut into about 20- μ m thick sections in order to observe three-dimensional images by CLSM, and optimal antibody concentrations, reaction times and reaction temperatures were determined in preliminary experiments. The results of fluorescence staining findings for CEA, CA 19-9, CA 54, and CA 602 using CLSM differed from those of immunoperoxidase staining. Since specimens suitable for examination by CLSM were prepared, it was possible to more precisely localize tumor marker antigens using CLSM than by light microscopy.

文 献

- 1) 高松哲郎, 南川哲寛, 藤田哲也: レーザー顕微鏡の原理, 技術と医学生物学への応用, 日本組織細胞化学会編, 組織細胞化学, pp. 171~181, 学際企画, 東京, 1991.
- 2) 石川春律: 共焦点レーザー顕微鏡の技術と医学生物学への応用, 日本組織細胞化学会編, 組織細胞化学, pp. 182~192, 学際企画, 東京, 1991.
- 3) 川島 徹, 喜納勝成, 石和 久: スライドに対する切片接着剤の検討—シランコーティングスライドの使用経験—, 病理と臨床, 8: 413~415, 1990.
- 4) Bast, Jr. R.C.: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma, J. Clin. Invest., 68: 1331~1337, 1981.
- 5) Kabawat, S.E.: Tissue distribution of a coelomic epithelium related antigen recognized by the monoclonal antibody OC 125, Int. J. Gynecol. Pathol., 2: 275~285, 1983.
- 6) Colette, C.A.K., Bhan, V.R., Zurawski, Jr., et al.: Carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate determinant 199 (CA 199) localization in 121 primary and metastatic ovarian tumors: An immunohistological study with the use of monoclonal antibodies, Int. J. Gynecol. Pathol., 1: 231~245, 1982.
- 7) 奥村晃久, 衛藤政志, 八木幸夫・他: 胆嚢悪性腫瘍の免疫組織学的検索—ケラチン蛋白および CEA の組織局在とその臨床細胞学的意義について—, J. Jpn. Soc. Cytol., 22: 174~181, 1983.
- 8) Robert, J.K., Parvin, G.: Contributions of immunocytochemistry to the diagnosis and study of ovarian neoplasms, Int. J. Gynecol. Pathol., 3: 3~26, 1984.
- 9) 野沢志朗, 矢島正純, 宇田川康博・他: 新しい腫瘍マーカー CA 54/61 の卵巣癌診断への応用, Oncol. & Chemo., 3: 376~380, 1992.
- 10) 野沢志朗, 宇田川康博, 佐々木宏輔・他: 卵巣癌の新しい腫瘍マーカー CA 54/61 および CA 602 の基礎的, 臨床的有用性の検討, 癌と化学療法, 19: 827~835, 1992.
- 11) Kobayashi, H., Ohi, H., Sugiura, M.: Characterization and clinical evaluation of tumor associated antigen CA 54/61 identified by monoclonal antibodies MA 54 and MA 61 epithelial ovarian cancer, Gynecol. Oncol., 47: 328~336, 1992.
- 12) 野沢志朗, 矢島正純, 佐々木宏輔・他: 卵巣癌に対する新しい腫瘍マーカー CA 54/61 について. KARKINOS, 1(2): 137~143, 1988.
- 13) 野沢志朗, 久布白兼行, 三上幹男・他: 糖鎖抗原系の

マーカー. 産科と婦人科, 3(15): 379~391, 1990.

- 14) 宇田川康博, 野沢志朗, 矢島正純: CA 54/61 CA 602とのコンビネーションアッセイも含めて, 大倉久直, 腫瘍マーカー最近の進歩, pp. 93~104, 中外医学社, 1992.
- 15) Yoshima, H.: Structure of the Asparagine-linked sugar chains of AFP purified from human asites fluid, Cancer Res., 40: 4276~4281, 1980.
- 16) 小幡憲郎, 児玉省二, 半藤 保: 酵素抗体法による卵巣

胚細胞腫における AFP, HCG および CEA の細胞内局在の研究, 日本産科婦人科学会雑誌, 32: 757~766, 1980.

- 17) 堤 寛: ABC 法, 渡辺慶一, 中根一穂編, 酵素抗体法第3版, pp. 188~195, 学際企画, 東京, 1992.
- 18) 川生 明: 免疫染色法, 川生 明編, 蛍光抗体法, pp. 21~41, ソフトサイエンス社, 東京, 1983.